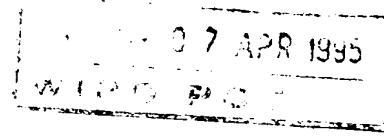


POEP 95700859  
**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

08-103118



**Bescheinigung**

**PRIORITY DOCUMENT**

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in 13476 Berlin hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

*"Verfahren zur Inhibierung sowie zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen"*

am 19. Oktober 1994 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole A 01 H 5/00, A 01 H 1/06, C 12 N 15/82, C 12 N 15/63, C 12 N 15/60 und C 12 N 1/21 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. März 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts  
Im Auftrag

Röske

Aktenzeichen: P 44 38 821.7

## Verfahren zur Inhibierung sowie zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung und Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen sowie DNA-Sequenzen und neue Plasmide, enthaltend diese DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase in der Pflanze verändern. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung dieser DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden.

Bedingt durch den kontinuierlich steigenden Nahrungsmittelbedarf, der aus der ständig wachsenden Weltbevölkerung resultiert, ist eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Steigerung des Ertrages von Nutzpflanzen zu bemühen. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, besteht in der Veränderung des Metabolismus der Pflanzen.

Das Wachstum, die Entwicklung und der Ertrag einer Nutzpflanze hängt von der Energie ab, die diese Pflanze durch Bildung von Kohlenhydraten während der Photosynthese gewinnt. Die primären Orte für die Photosynthese sind das Blatt und zu einem geringen Ausmaß das Stammgewebe. Andere Organe der Pflanze, wie Wurzeln, Samen und Knollen tragen nicht wesentlich zur Produktion von Photoassimilaten bei, sondern sind im Gegenteil in ihrem Wachstum von der Versorgung durch photosynthetisch aktive Organe abhängig. Die photosynthetisch aktiven Gewebe werden als Quellen oder "sources" bezeichnet. Sie werden als Nettoexporteure des während der Photosynthese fixierten CO<sub>2</sub> definiert. Die photosynthetisch inaktiven Teile der Pflanze werden als Senken oder "sinks" bezeichnet. Sie werden als Nettoimporteure des photosynthetisch fixierten Kohlendioxids definiert.

Die Samen einer Pflanze beispielsweise sind völlig von der Photosyntheseleistung der "sources" abhängig, d.h. von der Verteilung der in den "sources" gebildeten Photoassimilate. Ein

Eingriff in den Metabolismus einer Pflanze, der die Verteilung der Photoassimilate verändert, kann daher von ganz entscheidender Bedeutung für den Ertrag einer Pflanze sein.

Im Fall der Kartoffel ist es beispielsweise wünschenswert, den Metabolismus der Pflanze dahingehend zu verändern, daß es zu einem möglichst effizienten Transport der Photoassimilate in die Speicherorgane, die Knollen, und zu einer möglichst maximalen Synthese von Stärke in den Knollen kommt.

Da die Vermehrung der Kartoffelpflanzen für landwirtschaftliche Zwecke in erster Linie vegetativ über Kartoffelknollen und nicht über Samen erfolgt, ist die Bildung von Blüten, d.h. potentiellen "sinks", die mit den Knollen um die gebildeten Photoassimilate konkurrieren, bei Kartoffelpflanzen, die lediglich für die Bereitstellung von Kartoffelknollen zur Stärkeproduktion vorgesehen sind, nicht notwendig.

Eine gezielte Inhibierung der Blütenbildung ist jedoch bei den meisten Pflanzen bisher nicht möglich, da der Prozeß der Induktion der Blütenbildung bei Pflanzen insgesamt noch nicht sehr gut verstanden ist. Als Induktoren der Blütenbildung werden verschiedene Substanzen wie z.B. Kohlenhydrate, Cytokinine, Auxin, Polyamine und Calcium diskutiert. Insgesamt ergibt sich aber der Eindruck, daß es sich bei der Blühinduktion um einen komplexen Vorgang handelt, bei dem mehrere bisher noch nicht eindeutig identifizierte Faktoren zusammenwirken (Bernier et al. (1993) *Plant Cell* 5:1147-1155).

Die Inhibierung der Blütenbildung bei Zuckerrohr, die zu einer erheblichen Steigerung des Zuckerertrages führt, ist möglich durch die exogene Applikation verschiedener synthetischer Wachstumsregulatoren (Monuron, Diuron, Diquat). Doch auch wenn durch den Einsatz derartiger synthetischer Wachstumsregulatoren die gewünschte Ertragssteigerung erreicht werden kann, so ist doch eine sorgfältige Abwägung von Nutzen und Schaden bei der Verwendung derartiger synthetischer Stoffe angeraten. Neben den sehr hohen Kosten, die meistens mit der Anwendung synthetischer Stoffe verbunden sind, gilt es insbesondere, die Auswirkungen auf die Umwelt durch biologisch nicht abbaubare oder nur bedingt abbaubare Stoffe zu berücksichtigen. Da in der Regel nur unzureichendes Wissen über die Umweltverträglichkeit vieler synthetischer Wachstumsregulatoren besteht, bringt eine

umfangreiche Anwendung dieser Substanzen in der Landwirtschaft immer ein erhebliches Risiko bezüglich der Langzeitwirkung auf die Umwelt mit sich.

Es erscheint daher wünschenswert, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die eine gezielte Inhibition der Blütenbildung bei verschiedenen Nutzpflanzen unter Vermeidung der Anwendung synthetischer Substanzen erlauben.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, bei der es aufgrund einer Veränderung der Aktivität eines Enzyms, das an respiratorischen Prozessen in den Zellen beteiligt ist, zu einer Veränderung des Blühverhaltens derartig veränderter Pflanzen führt.

Respiratorische Prozesse spielen wie in Tieren auch in Pflanzen eine essentielle Rolle bei der Versorgung der Zellen mit Energie zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus. Hierbei werden durch den Abbau organischer Substrate (Zucker, Fette oder Proteine), in dessen Verlauf Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, energiereiche Verbindungen, in erster Linie ATP, hergestellt. Diese können anschließend für biosynthetische Prozesse im Rahmen von Wachstums- und Entwicklungsprozessen verwendet werden.

Eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Aminosäuren sowie bei der Bereitstellung von Ausgangssubstanzen für viele Biosynthesereaktionen spielt in pflanzlichen wie in tierischen Zellen der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus, Zitronensäure-Zyklus, Krebs-Zyklus), der in den Mitochondrien der Zellen abläuft.

In diesen Zyklus wird das Zwischenprodukt Acetyl-CoenzymA, das sowohl beim Abbau von Kohlenhydraten über die Glykolyse, als auch beim Abbau von Fettsäuren durch die  $\beta$ -Oxidation entsteht, eingeschleust und im Verlauf des Zyklus in Kohlendioxid und reduzierte Coenzyme (NADH, FADH<sub>2</sub>) umgewandelt.

Das Enzym, das für den Eintritt des Acetyl-CoAs in den TCA-Zyklus verantwortlich ist, ist die Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.). Dieses Enzym katalysiert die Aldolkondensation von Acetyl-CoenzymA und Oxalacetat zu Citrat unter Freisetzung von reduziertem CoenzymA.

Die Citrat-Synthase nimmt innerhalb des Stoffwechsels eine zentrale Stellung ein, da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion essentiell ist für die Einschleusung des Substrats Acetyl-CoenzymA in den Citrat-Zyklus. Entsprechend der Schlüsselstellung, die dieses Enzym im Metabolismus der Zelle einnimmt, wird seine Aktivität in vielfältiger und komplexer Art und Weise reguliert.

Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Citrat-Synthase fanden bisher schwerpunktmäßig bei Prokaryonten, Pilzen und Tieren statt. So sind beispielsweise bereits bei einer Reihe von Prokaryonten Gene beschrieben, die für Citrat-Synthase kodieren, z.B. bei *E.coli*, *Acinetobacter anitratum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia prowazekii*, *Bacillus* sp. (Schendel et al. (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:335-345 und Referenzen darin), *Coxiella burnetii* (Heinzen et al. (1991) Gene 109:63-69) und *Haloferax volcanii* (James et al. (1992) Biochem. Soc. Trans. 20:12). Ebenso sind bereits bei *Saccharomyces cerevisiae* (Suissa et al. (1984) EMBO J. 3:1773-1781) und *Neurospora crassa* (Ferea et al. (1994), Mol. Gen. Genet. 242:105-110) derartige Gene bekannt. Bei Tieren ist lediglich das Gen für die Citrat-Synthase aus Schwein bekannt (Bloxham et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5381-5385).

Pflanzliche Citrat-Synthasen sind bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht worden. Lediglich in wenigen Fällen wurde das Enzym angereinigt, z.B. aus Blättern von *Pisum sativum* (Unger und Vasconcelos (1989) Plant Physiol. 89:719-723) oder *Ricinus-Sämlingen* (Kagawa und Gonzalez (1981) Plant Physiol. 68:845-850). Und nur in einem einzigen Fall, bei *Arabidopsis thaliana*, wurde bisher eine cDNA-Sequenz isoliert, die für eine pflanzliche Citrat-Synthase kodiert (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418).

Angesichts der Bedeutung der Citrat-Synthase für den Metabolismus der Zelle ist fraglich, ob Pflanzen eine Reduktion oder Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in allen oder in bestimmten Organen tolerieren. Insbesondere ist nicht bekannt, ob es möglich ist, transgene Pflanzen mit einer reduzierten Citrat-Synthaseaktivität herzustellen. Für die Herstellung von Pflanzen mit reduzierter Citrat-Synthaseaktivität ist es notwendig, Citrat-Synthase-Kodierregionen solcher Pflanzenspezies zur Verfügung zu stellen, mit denen transgene Pflanzen in großer Anzahl erzeugt werden können. Pflanzenspezies, die dieser Anforderung gerecht werden, sind beispielsweise *Solanum tuberosum* und *Nicotiana*

*tabacum*. Die genetische Veränderung von *Solanum tuberosum* durch Agrobakterien vermittelten Gentransfer ist ausreichend beschrieben (Fraley et al. (1985) Crit. Rev. Plant. Sci. 4:1-46). Ebenso ist die genetische Veränderung von Tabak mit Hilfe gentechnischer Methoden beschrieben.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß eine starke Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu einer vollständigen Inhibierung der Blütenbildung bei diesen Pflanzen führt (Fig. 8).

Des weiteren wurde gefunden, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu stark verringerten Lagerungsverlusten bei der Lagerung von Kartoffelknollen sowie einer Veränderung des Keimungsverhaltens der Knollen führt.

Darüberhinaus wurde gefunden, daß eine erhöhte Expression der Citratsynthase in Zellen transformierter Kartoffelpflanzen zu einem veränderten Blühverhalten der Pflanzen führt, insbesondere zu einer vorzeitigen Blütenbildung und zu einem verstärkten Blütenansatz.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, beide dadurch gekennzeichnet, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene gehemmt wird.

Besonders bevorzugt sind in beiden Fällen Verfahren, in denen die Inhibierung der Blütenbildung bzw. die Verbesserung der Speicherkapazität dadurch erreicht wird, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bilden die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierenden Pflanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie eine veränderte Citrat-Synthase-Aktivität aufweisen.

Des Weiteren sind Gegenstand der Erfindung DNA-Sequenzen aus Pflanzen der Familie der Solanacea, insbesondere der Spezies *Solanum tuberosum* (siehe Seq ID No. 1) und *Nicotiana tabacum*

(siehe Seq ID No. 3), sowie der Familie der Chenopodiaceae, insbesondere der Spezies *Beta vulgaris* (siehe Seq ID No. 2), die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase enthalten, und die nach Integration in eine pflanzliches Genom und Expression zur Synthese einer nicht-translatierbaren RNA führen, durch die die Synthese endogener Citrat-Synthasen inhibiert werden kann, oder zur Synthese einer translatierbaren RNA führen, durch die die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen erhöht werden kann, sowie DNA-Sequenzen, die für ein Protein mit einer der unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenzen kodiert. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Plasmide und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenzen oder Teile oder Derivate davon.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für Citrat-Synthase kodieren, für die Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, insbesondere der DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*, in Kombination mit Steuerelementen zur Expression in pro- und eukaryontischen Zellen, die Verwendung zur Expression einer nichttranslatierbaren mRNA, die die Synthese endogener Citrat-Synthasen in den Zellen verhindert, sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen zur Isolierung ähnlicher Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.

Gegenstand der Erfindung ist darüberhinaus die Verwendung von DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Citratsynthase kodieren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, sowie ein Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes DNA-Molekül in Zellen eingeführt wird und es dadurch in diesen Zellen zu einer zusätzlichen Expression eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Citratsynthase kommt, was in transformierten Pflanzen zu einer vorzeitigen und verstärkten Blütenbildung führt. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, beide dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle eine DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) die Expression endogener Citratsynthase-Gene aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

Die Expression einer DNA, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist, wird in der Regel dadurch erreicht, daß ein DNA-Molekül umfassend eine Expressionskassette mit folgenden Bestandteilen in das Genom der Pflanzen integriert und exprimiert wird:

- A) einem in Pflanzen funktionalen Promotor,
- B) einer für Citrat-Synthase kodierenden DNA-Sequenz, die in anti-sense Orientierung an den Promotor fusioniert ist, so daß der nicht-kodierende Strang abgelesen wird, und
- C) einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Die vorliegende Erfindung stellt derartige DNA-Moleküle, die derartige Expressionskassetten enthalten, in Form des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880), das die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffeln umfaßt, und des Plasmids TCSAS (DSM 9359), das die kodierende Region von Citrat-Synthase aus Tabak umfaßt, zur Verfügung, deren Zusammensetzung in den Ausführungsbeispielen 3 bzw. 8 beschrieben ist.

Als Promotor kann im Prinzip jeder in Pflanzen aktive Promotor verwendet werden. Der Promotor soll sicherstellen, daß das gewählte Gen in der Pflanze exprimiert wird. Der Promotor kann dabei so gewählt werden, daß die Expression nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse

determinierten Zeitpunkt erfolgt. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die Pflanze sein.

Der Einsatz gewebespezifischer Promotoren stellt einen bevorzugten Gegenstand der Erfindung dar.

Die vorliegende Erfindung stellt DNA-Sequenzen zur Verfügung, durch deren Verwendung Veränderungen der Citrat-Synthaseaktivität in Pflanzen, insbesondere in Kartoffelpflanzen und Tabakpflanzen, tatsächlich und nachweisbar möglich sind.

Es handelt sich dabei um Sequenzen mit der kodierenden Region von Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*.

Eine bevorzugten Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die aus einer Pflanze der Familie der *Solanaceae* oder der Familie der *Chenopodiaceae* stammt und für eine Citrat-Synthase kodiert. Besonders bevorzugt werden DNA-Sequenzen verwendet, die für eine Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum* kodieren, vorzugsweise Sequenzen, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren, insbesondere Sequenzen mit der unter Seq. ID No.1 angegebenen Nukleotidabfolge.

Nach der Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880), das die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffel in anti-sense Orientierung unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV umfaßt (siehe Ausführungsbeispiel 3) in das Genom einer Kartoffelpflanze kommt es zu einer starken Reduktion der Citrat-Synthase-Aktivität in den Zellen transformierter Pflanzen (siehe Fig. 7) und zur Inhibierung der Blütenbildung (siehe Fig. 8).

Eine weitere bevorzugten Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* kodiert, vorzugsweise eine Sequenz, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert,

und insbesondere eine Sequenz mit der weiter Seq. ID No. 3 angegebenen Nukleotidabfolge.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine Citrat-Synthase aus *Beta vulgaris* kodiert, vorzugsweise eine Sequenz, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert, und insbesondere eine Sequenz mit der weiter Seq. ID No. 2 angegebenen Nukleotidabfolge.

Die anti-sense Orientierung der in Schritt B) des Verfahrens genannten kodierenden DNA-Sequenz in bezug auf den Promotor bewirkt, daß in den transformierten pflanzlichen Zellen eine nicht-translatierbare mRNA gebildet wird, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase verhindert.

Anstatt der gesamten unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 und Seq ID No. 3 angegebenen erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch Teilsequenzen davon für die anti-sense-Inhibition verwendet werden. Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente anti-sense Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind, in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100% ist zu bevorzugen.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Sequenzen, die sich aus den unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 dargestellten Sequenzen durch Insertion, Deletion oder Substitution ergeben, ohne daß dadurch die inhibierende Wirkung

der anti-sense-Sequenz aufgehoben wird, in Verfahrensschritt B) des obengenannten Verfahrens.

Bei den für die Konstruktion von anti-sense Konstrukten verwendeten DNA-Fragmenten kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden.

Eine Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität in Pflanzenzellen kann ebenfalls erreicht werden durch die Einführung einer DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch Transkripte von endogenen Citrat-Synthase-Genen endonukleolytisch spaltet. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle an spezifischen Zielsequenzen zu spalten. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe wird gebildet von Ribozymen die dem Typ der Gruppe-I-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmoleküls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, erscheint es daher im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Die Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Aktivität der Citrat-Synthase drastisch reduziert ist, kann daher auch erfolgen durch Einführung und Expression eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls in Pflanzen, das sich zusammensetzt aus:

- a) einem in Pflanzen funktionalen Promotor

- b) einer DNA-Sequenz, die für eine katalytische Domäne eines Ribozyms kodiert und die flankiert ist von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu Sequenzen des Zielmoleküls, und
- c) , falls erforderlich, einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Für die unter Punkt b) genannte Sequenz kommt z.B. die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., 1990, *Virology*, 177:216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al., 1992, *EMBO J.*, 11:1525-1530; Haseloff and Gerlach, 1988, *Nature* 334:585-591) in Betracht.

Die DNA-Sequenzen, die die katalytische Domäne flankieren, werden gebildet von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu den Sequenzen endogener Citrat-Synthase-Gene.

Für die unter a) und c) genannten Sequenzen gilt dasselbe, das schon oben für die Konstruktion von anti-sense-Konstrukten angeführt wurde.

Es wurde gefunden, daß es nach der Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) in Zellen und Integration in das Genom einer Kartoffelpflanze neben der Inhibierung der Blütenbildung zu einer verstärkten Synthese von Stärke in den Kartoffelknollen kommt.

Durch die Kultivierung derartig veränderter Pflanzen ist es möglich, auf die Verwendung synthetischer Wachstumsregulatoren zu verzichten und somit Kosten zu senken und Risiken für die Umwelt zu vermeiden.

Die gezielte Inhibierung der Blütenbildung über die Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität ist daher nicht nur für die Kartoffel von Interesse, sondern sollte von breiterer Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und die Landwirtschaft sein. Genannt sei z.B. die Möglichkeit, durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen eine zeitlich determinierte Blühinduktion oder -inhibierung zu erreichen. Dies kann für die Vermeidung von Frostschäden eine Rolle spielen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl auf dikotyle Pflanzen als auch auf monokotyle Pflanzen angewendet werden. Pflanzen, denen dabei besonderes Interesse gilt, sind Nutzpflanzen, wie Getreidearten (z.B. Roggen, Weizen, Hafer, Gerste etc.), Obstarten (z.B. Aprikose, Pfirsich, Apfel, Pflaume etc.), Gemüsearten (z.B. Tomaten, Broccoli, Spargel etc.), Zierpflanzen oder andere wirtschaftlich interessante Pflanzenarten (z.B. Tabak, Raps, Sojabohne, Sonnenblume etc.).

Von besonderem Interesse ist die Anwendung der vorliegenden Erfindung bei der Zuckerrübe. Ein wesentliches Problem beim Zuckerrübenanbau betrifft das Auftreten von "Schossen" bereits im ersten Jahr. Neben der damit einhergehenden Ertragseinbuße führt diese Schossung zur Bildung von Blüten und damit von Samen, die in der Fruchtwechselfolge stark störende Effekte aufweisen. Da die Schossung durch niedrige Temperaturen induziert wird, wird gegenwärtig das Saatgut relativ spät ausgesetzt (im April/Mai), um eine Schossung zu vermeiden. Die Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität führt, wie hier gezeigt, in transgenen Kartoffeln zur Inhibierung der Blütenbildung. Aufgrund dieser Beobachtung ist es offensichtlich, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthase in Zuckerrüben zu einer Reduktion der Schossung führt. Dieses erlaubt, den Zuckerrübensamen früher auszulegen, was dann aufgrund der verlängerten Vegetationsperiode zu einem erhöhten Ertrag führt.

Die vorliegende Erfindung stellt nun DNA-Sequenzen aus der Zuckerrübe zur Verfügung (Seq ID No. 2), die für eine Citrat-Synthase kodieren. Mit Hilfe dieser Sequenzen ist es möglich, transgene Zuckerrüben nach einem der oben beschriebenen Verfahren herzustellen, bei denen die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen stark reduziert ist, wodurch es zu einer Inhibierung bzw. Verzögerung der Blütenbildung kommt.

Die Speicherorgane der Kartoffel enthalten als Speicherstoff im wesentlichen Stärke. Die Metabolisierung der Stärke durch Respiration liefert die Energie, die beim Auskeimen der Knolle benötigt wird. Im Falle der Saatkartoffeln ist das jahreszeitlich frühe Auskeimen der Knollen von Interesse; bei Kartoffelknollen, die zu Speisezwecken verwendet werden, ist die Bildung von Sprossen jedoch nachteilig. Einerseits steigt im Verlauf der Auskeimung die Respiration stark an, was in erster Linie auf eine

Metabolisierung des Hauptspeicherstoffes Stärke zurückzuführen ist, andererseits verändert sich auch die Konsistenz der Knolle, die an Festigkeit verliert und im Geschmack nachläßt. Um das Auskeimen während der Lagerung oder des Transports zu verhindern, müssen diese trocken und kühl gehalten werden, da Temperaturen über 8°C und Feuchtigkeit als Indikatoren des Beginns der Vegetationsphase Signale für die Sproßbildung sind. Diese Art der Lagerung ist zum einem sehr kostenintensiv, da sie spezielle klimatisierte Räume erfordert, und zum anderen hat sie auch negative Konsequenzen für die stoffliche Zusammensetzung der Knolle: niedrige Temperaturen führen bei Kartoffelknollen zu einer Umwandlung von Stärke in wasserlösliche Zucker. Dieser als *cold sweetening* bezeichnete Effekt wird als eine Adaptation an Standorte mit Temperaturen unter dem Gefrierpunkt diskutiert, da wäßrige Lösungen mit steigender Konzentration an gelösten Stoffen eine zunehmende Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Der Abbau von Stärke in den Knollen zu reduzierenden Zuckern führt zu einer Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe und senkt insofern die Temperatur, bei der es zur Bildung von Eiskristallen in den Zellen kommt. Die Qualität der Kartoffelknolle als Nahrungsmittel wird jedoch durch das *cold sweetening* erheblich herabgesetzt, da die gesteigerte Konzentration an reduzierenden Zuckern die Konsistenz der Knollen verändert, beispielsweise kommt es beim Fritieren zu einer unerwünschten Braunfärbung des Gewebes infolge einer Maillard-Reaktion.

Überraschend wurde gefunden, daß nach Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) in Zellen und Integration in das Genom einer Kartoffelpflanze die Metabolisierung der Stärke in den Speichergeweben inhibiert und dadurch das Auskeimen der Kartoffelknollen unterbunden wird. Dies führt zu einer verbesserten Lagerungsfähigkeit der Knollen, so daß diese für lange Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden können.

Bereits vor dem Auskeimen findet auch in der ruhenden Kartoffelknolle eine Metabolisierung des Speicherstoffes Stärke statt. Diese ist zwar im Vergleich zu der während der Keimung stattfindenden Metabolisierung relativ gering, kann aber dennoch

zu erheblichen Verlusten an Stärke bei langer Lagerung der Kartoffelknollen führen.

Durch Inhibierung der Respiration in den Kollen, können diese Lagerungsverluste verringert werden.

Durch Modifikation der in Ausführungsbeispiel 3 und 8 beschriebenen Durchführungen kann auch eine Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Geweben einer transformierten Pflanze erreicht werden. Hierzu wird eine für Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenz in *sense*-Orientierung an einen Promotor fusioniert, d.h. das 3'-Ende des Promotors wird mit dem 5'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz verknüpft. Dies führt zur Expression einer für Citrat-Synthase kodierenden mRNA und folglich zu einer verstärkten Synthese dieses Enzyms. Die Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen führt zu einer Veränderung des Blühverhaltens transformierter Pflanzen im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen. Insbesondere kommt es zu einer Induktion der Blütenbildung. Darunter wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung verstanden:

- a) eine vorzeitige Blütenbildung (das bedeutet in diesem Zusammenhang, daß transformierte Pflanzen im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen früher blühen, in der Regel einige Tage früher, vorzugsweise eine bis mehrere Wochen früher) und/oder
- b) eine verstärkte Blütenbildung (das bedeutet in diesem Zusammenhang, daß transformierte Pflanzen im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen mehr Blüten ansetzen, vorzugsweise mindestens 10% mehr Blüten ansetzen).

Ein derartiger Effekt ist wünschenswert bei einer Reihe von Kulturpflanzen wie z.B. Tomate, Paprika, Kürbis, Melone, Gurke, Zucchini, Raps, Getreidearten, Mais oder Baumwolle und bei verschiedenen Zierpflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung von DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Citrat-Synthase kodieren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, sowie ein Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die homologen oder heterologen Ursprungs ist und die für ein Protein mit Citrat-Synthase-Aktivität kodiert,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) es aufgrund dieser Expression zu einer Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den transgenen Zellen kommt und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

Die unter Punkt a) des Verfahrens genannten DNA-Sequenzen, die für Citrat-Synthase kodieren, können dabei sowohl homologen bzw. nativen als auch heterologen bzw. fremden Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Wirtspflanze sein. Sie können sowohl pro- als auch eukaryontischen Ursprungs sein. Bekannt sind beispielsweise für Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenzen aus folgenden Organismen: *Bacillus subtilis* (U05256 und U05257), *Arabidopsis thaliana* (Z17455), *A. anittraum* (M33037), *B. coagulans* (M74818), *C. burnetii* (M36338), *E. coli* (V01501), *M. smegmatis* (X60513), *P. aeruginosa* (M29728), *R. prowazekii* (M17149), *T. acidophilum* (X55282), *T. thermophila* (D90117), *Schwein* (M21197), *N. crassa* (M84187) und *S. cerevisiae* (Z11113, Z23259, M14686, M54982, X00782). Die in den Klammern angegebenen Zahlen geben jeweils die Zugriffsnummern an, unter denen diese Sequenzen in der GenEMBL-Datenbank zugänglich sind. Die Sequenzen können sowohl mit Hilfe gängiger molekularbiologischer Techniken aus den genannten Organismen isoliert werden oder synthetisch hergestellt werden.

Mit Hilfe des erfundungsgemäßen Verfahrens kann eine Erhöhung der Citratsynthase-Aktivität grundsätzlich in jedem Kompartiment einer transformierten Zelle erreicht werden. Vorzugsweise wird eine Erhöhung der Aktivität in den Mitochondrien oder dem Cytosol erfolgen.

Um die Lokalisation der Citratsynthase in einem bestimmten Kompartiment der transformierten Zellen zu gewährleisten, muß die kodierende Sequenz mit den für die Lokalisation in das jeweilige Kompartiment notwendigen Sequenzen verknüpft werden. Derartige Sequenzen sind bekannt. Für die Lokalisation der Citratsynthase in den Mitochondrien ist es beispielsweise erforderlich, daß das

exprimierte Protein am N-Terminus eine mitochondriale Targetsequenz (Signalsequenz) aufweist, die den Transport des im Cytosol exprimierten Proteins in die Mitochondrien gewährleistet. Weist das verwendete Gen nicht bereits eine Sequenz auf, die für eine Targetsequenz kodiert, so muß mit Hilfe gentechnologischer Methoden eine derartige Sequenz eingeführt werden. Eine Sequenz, die für eine mitochondriale Targetsequenz kodiert ist beispielsweise aus Braun et al. (1992, EMBO J. 11: 3219-3227) bekannt. Die Sequenz muß derart mit der kodierenden Region verknüpft werden, daß das durch die Targetsequenz kodierte Polypeptid im gleichen Leserahmen wie die nachfolgende für Citratsynthase kodierende DNA-Sequenz liegt.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht die Verwendung von DNA-Sequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae* vor, die für Citrat-Synthase kodieren, insbesondere die Verwendung der von Suissa et al. (1984, EMBO J. 3:1773-1781) beschriebenen DNA-Sequenzen.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in einem Verfahren, bei dem die für eine Citrat-Synthaseaktivität kodierende DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert. Es können auch kürzere DNA-Sequenzen verwendet werden, die nur für Teile der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren, solange gewährleistet ist, daß das resultierende Protein die enzymatische Aktivität einer Citrat-Synthase aufweist.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform besteht in einem Verfahren, bei dem die für eine Citrat-Synthaseaktivität kodierende DNA-Sequenz die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt, wobei dieser Teil lang genug ist, um für ein Protein zu kodieren, das Citrat-Synthaseaktivität aufweist.

Für die Wahl eines geeigneten Promotors gilt dasselbe, was oben schon im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung gesagt wurde.

Es wurde gefunden, daß es nach der Einführung des Plasmids pHSmCS (siehe Ausführungsbeispiel 9 und Figur 9) in Zellen und Integration in das Genom einer Kartoffelpflanze bei den transformierten Kartoffelpflanzen zu einem veränderten Blühverhalten kommt. Mit diesem Plasmid transformierte Kartoffelpflanzen blühen im Vergleich zu nicht transformierten Kartoffelpflanzen wesentlich früher (unter Gewächshausbedingungen im Durchschnitt 2-4 Wochen) und setzten ca. mindestens 10% mehr Blüten an.

Durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen, z.B. temperaturinduzierten Promotoren, besteht auch die Möglichkeit der zeitlich determinierten Blühinduktion oder Blühinhibierung, je nachdem ob die DNA-Sequenz in *sense*- oder *antisense*-Orientierung an den Promotor fusioniert ist.

So sind unter anderem Promotoren für eine spezifische Expression in Blütenanlagen (Huijser et al. (1992) EMBO J. 11:1239-1249) oder in photosynthetisch aktiven Geweben bekannt.

Zur Verhinderung des Auskeimens von Kartoffelknollen, sowie der Lagerverluste durch Metabolisierung der Stärke sind solche Promotoren sinnvoll, die eine Aktivierung der Transkription in den Speicherorganen sicherstellen. Durch Kombination mit exogen regulierbaren Steuerelementen, beispielsweise wundinduzierbaren oder temperaturregulierten Promotoren, kann auch das Problem der vegetativen Vermehrung bei Kartoffelpflanzen, deren Knollen bei Inhibierung der Citrat-Synthase nicht auskeimen, gelöst werden. Bei der Zuckerrübe kann in analoger Weise durch Verwendung eines rübenspezifischen Promotors die Respiration reduziert und dadurch ein Ertragsverlust durch Zuckerabbau in den Rüben verhindert werden.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Insertion, Deletion oder Rekombination

von DNA-Sequenzen in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen erlauben.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können ferner dazu genutzt werden, um aus dem Genom von Pflanzen verschiedener Spezies homologe Sequenzen zu isolieren, die ebenfalls für eine Citrat-Synthase kodieren. Homologie bedeutet in diesem Zusammenhang eine Sequenzidentität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und insbesondere über 95%. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Sequenzen erfolgt dabei nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY). Mit diesen Sequenzen können wiederum Konstruktionen zur Transformation von Pflanzen oder Mikroorganismen hergestellt werden.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helperplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam (1985), Chapter V;

Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

#### Hinterlegung

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt.

Am 28.12.1993 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) folgende Plasmide hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pPCS (DSM 8879)

Plasmid pKS-CSa (DSM 8880)

Am 10.08.1994 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) folgende Plasmide hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pTCS (DSM 9357)

Plasmid pSBCS (DSM 9358)

Plasmid TCSAS (DSM 9359)

#### Verwendete Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
EDTA	(Ethylendinitriolo)tetraessigsäure
50x Denhardt-Lösung	5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia) 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g Rinderserumalbumin (Fraktion V, Sigma) ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinucleotid, reduziert
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NADH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SCMo-Virus	"subterranean clover mottle virus"
SDS	Natriumdodecylsulfat
20x SSC	175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O, pH 7,0 mit 10 N NaOH
TobR-Virus	"tobacco ringspot virus"
Trizin	N-Tris(hydroxymethyl)-Methylglycin

### Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das Plasmid pPCS (DSM 8879)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript KS. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum* kodiert.  
Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pKS-CSa (DSM 8880)

#### Aufbau des Plasmids:

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437  
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)
- B= Fragment B: cDNA aus *Solanum tuberosum* kodierend für Citrat-Synthase;  
BamHI/SalI-Fragment, ca. 1900 bp  
Orientierung zum Promotor: anti-sense
- C= Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACh5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Fig. 3 zeigt das Plasmid pSBCS (DSM 9358)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript SK. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Beta vulgaris L.* kodiert.  
Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 4 zeigt das Plasmid pTCS (DSM 9357)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript SK. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* kodiert.

Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 5 zeigt das Plasmid TCSAS (DSM 9359)

Aufbau des Plasmids:

A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437  
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

B = Fragment B: cDNA aus *Nicotiana tabacum*, kodierend für Citrat-Synthase;  
BamHI/SalI-Fragment aus pTCS, ca. 1800 bp  
Orientierung zum Promotor: anti-sense

C= Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Fig. 6 zeigt das Ergebnis eines Northern-Blot Experiments

Zur Analyse wurden jeweils 2 µg poly(A<sup>+</sup>)-mRNA aus verschiedenen transgenen Kartoffelpflanzen (Spur 4-8) und drei nicht-transformierten Kartoffelpflanzen (Spur 1-3) verwendet.

Spuren 1, 2, und 3 : Wildtyp *Solanum tuberosum* cv. Désirée  
Spur 4: transgene Kartoffellinie T6  
Spur 5: transgene Kartoffellinie T21  
Spur 6: transgene Kartoffellinie T29  
Spur 7: transgene Kartoffellinie T50  
Spur 8: transgene Kartoffellinie T55

Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffeln verwendet.

Fig. 7 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität in Blättern, Knollen und in Mitochondrien aus Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen im Vergleich mit Pflanzen der transgenen Kartoffellinien T6, T29, T50 und T55

Fig. 8 zeigt transgene Kartoffelpflanzen der Linien T6 (Nr. 3 und 4) und T29 (Nr. 5 und 6), die mit dem Plasmid pKS-CSa transformiert wurden, im Vergleich mit Wildtyp-Pflanzen (Nr. 1 und 2). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit, bei 22°C für 16 h im Licht und bei 15°C für 8h in Dunkelheit gehalten.

Fig. 9 zeigt das Plasmid pHs-mCS

Aufbau des Plasmids:

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437  
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)
- B= Fragment B: 99 bp langes DNA-Fragment, das für die Mitochondrientargetsequenz der Matrix Processing Peptidase (MPP) kodiert (Braun et al., 1992, EMBO J. 11:3219-3227)
- C= Fragment C: DNA-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* kodierend für Citrat-Synthase (Nukleotide 376-1818; Suissa et al., 1984, EMBO J. 3:1773-1781)  
Orientierung zum Promotor: sense
- D= Fragment D: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

### 1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescriptKS und der Vektor pBluescriptSK (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR kloniert.

### 2. Bakterienstämme

Für den pBluescriptKS-Vektor und für die pBinAR-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die *in vivo excision* wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen und Tabakpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J. 8:23-29).

### 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16:9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige&Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50  $\mu$ l einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20  $\mu$ g/l Naphthylessigsäure, 20  $\mu$ g/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80% Bacto Agar gelegt.

### 5. Transformation von Tabak

Eine Übernachtkultur des entsprechenden *Agrobacterium tumefaciens*-Klons wurde abzentrifugiert (6500 rpm; 3 min) und die Bakterien wurden in YEB-Medium resuspendiert.

Tabakblätter einer Tabaksterilkultur (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun NN*) wurden in kleine ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke zerschnitten und in der Bakteriensuspension gebadet. Die Blattstücke wurden anschließend auf MS-Medium (0,7% Agar) gelegt und 2 Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke zur Sproßinduktion auf MS-Medium (0,7% Agar) mit 1,6% Glukose, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,2 mg/l Naphtylessigsäure, 500 mg/l Claforan und 50 mg/l Kanamycin gelegt. Das Medium wurde alle 7 bis 10 Tage gewechselt. Wenn sich Sproße entwickelt haben, wurden die Blattstücke in Glasgefäße, die dasselbe Medium, enthielten, überführt. Entstehende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS-Medium + 2% Saccharose + 250 mg/l Claforan gegeben und aus ihnen ganze Pflanzen regeneriert.

## 6. Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität in Geweben transgener Kartoffelpflanzen und nicht-transformierter Kartoffelpflanzen

Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden Rohextrakte aus Knollen, Blättern und Blüten hergestellt sowie Mitochondrien aus Kartoffelknollen isoliert. Für die Herstellung von Rohextrakten wurde das jeweilige Material in flüssigem Stickstoff gefroren, in Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) *Planta* 182:445-454) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand anschließend für den Aktivitätstest verwendet. Für die Isolierung von Mitochondrien aus Kartoffelknollen wurden 100-200 g frisch geerntete Knollen geschält und in 100 ml "Grinding buffer" (0,4 M Mannitol, 1 mM EDTA, 25 mM MOPS, 0,1% BSA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,05 mM PMSF, pH 7,8) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Baumwoll-Gaze filtriert und für 4 min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 2 Lagen "Miracloth" (Calbiochem) gefiltert und nochmals für 30 min bei 18000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer weichen Bürste in 2 ml Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 20 mM Trizin, 2 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert. Nach zweifacher Homogenisierung in einem "Potter"-Homogenisator wurde der Extrakt auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradient geschichtet und 1 h bei 72000

g zentrifugiert. Mitochondrien wurden aus der 28%/45%-Interphase entnommen, gewaschen und zweimal für 15 min bei 14500 g in "Washing buffer" (0,4 M Mannitol, 5 mM MOPS, 0,1% BSA, 0,2 mM PMSF, pH 7,5) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in 100  $\mu$ l Resuspensionspuffer aufgenommen. Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden 5  $\mu$ l der Mitochondriensuspension in 100  $\mu$ l Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) *Planta* 182:445-454) aufgenommen.

Die Citrat-Synthaseaktivität wurde spektralphotometrisch bei 412 nm und 30°C nach der Methode von Srere (1967, *Methods in Enzymology* 13:3-22) bestimmt.

## 7. RNA-Extraktion und Northern Blot-Experimente

RNA wurde aus gefrorenem Pflanzenmaterial isoliert wie beschrieben in Logemann et al. (1987, *Anal. Biochem.* 163:21-26). Die RNA wurde denaturiert in 40% Formamid. Anschließend wurde die RNA geelektrophoretisch auf Formaldehyd/Agarosegelen aufgetrennt und nach dem Gellauf auf Nylonmembran (Hybond N; Amersham, UK) geblottet. Die Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte DNA-Probe erfolgte nach Standardmethoden.

## 8. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit und 22 °C für 16 h im Licht und 15 °C für 8 h in Dunkelheit gehalten. Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit und 25 °C für 14 h im Licht und 20 °C in Dunkelheit gehalten.

### Ausführungsbeispiele

#### Ausführungsbeispiel 1

##### Klonierung einer cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffel

Für die Identifizierung einer cDNA aus Kartoffel, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde zunächst ein DNA-Fragment der bereits bekannten cDNA von Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*

(Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418) amplifiziert. Hierfür wurde aus grünem Pflanzengewebe von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen Gesamt-RNA extrahiert und aus dieser poly(A<sup>+</sup>)-mRNA präpariert. Diese wurde anschließend für die Herstellung von cDNA verwendet. Aus dieser cDNA-Präparation wurde mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide

5'-AAGTGGATCCATGGTCTTCCGCAGCGTAT-3' und  
5'-CATAGGATCCTTAAGCAGATGAAGCTTCTTA-3',

die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der kodierenden Region der cDNA der Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13: 411-418) sind, durch eine "Polymerase Chain Reaction" (PCR) ein 1438 bp langes DNA-Fragment isoliert, das für die Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* kodiert. Die verwendeten Oligonukleotide führen zusätzlich an beiden Enden des amplifizierten DNA-Fragments BamHI-Schnittstellen ein. Das aus der PCR-Reaktion resultierende DNA-Fragment wurde mit BamHI verdaut und in das mit BamHI geschnittene Plasmid pUC9.2 ligiert. Die cDNA-Insertion dieses Plasmids wurde später als heterologe Probe für die Identifizierung einer für Citrat-Synthase kodierenden cDNA aus Kartoffel verwendet.

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde aus Blättern von Kartoffelpflanzen poly(A<sup>+</sup>)-mRNA isoliert. Ausgehend von der poly(A<sup>+</sup>)-mRNA wurde cDNA hergestellt, die mit EcoRI/NotI-linkern versehen wurde, und mit der eine cDNA-Bibliothek in dem Vektor Lambda ZAP II (Stratagene) angelegt wurde (Koßmann et al. (1992) Planta 188:7-12). 250000 Plaques dieser cDNA-Bibliothek wurden mit Hilfe der heterologen Probe aus *Arabidopsis thaliana* auf DNA-Sequenzen hin untersucht, die homolog zu dieser sind. Dazu wurden die Plaques auf Nitrozellulose-Filter übertragen und durch NaOH-Behandlung denaturiert. Die Filter wurden anschließend neutralisiert, und die DNA auf den Filtern durch Hitzebehandlung fixiert. Die Filter wurden in 25% Formamid, 0,5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 und 100 µg/ml Lachssperma-DNA prähybridisiert für 2 Stunden bei 42°C. Anschließend wurden die Filter in 25% Formamid, 0,5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 und 100 µg/ml Lachssperma-DNA nach Zugabe der P<sup>32</sup>-markierten, für Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana*

kodierenden cDNA über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die Filter wurden für 30 min in 5xSSC, 0.5% SDS bei 42°C und für 20 min in 3xSSC, 0.5% SDS bei 42°C gewaschen.

Phagenklone der cDNA-Bibliothek, die mit der verwendeten cDNA aus *Arabidopsis thaliana* hybridisierten, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen E.coli-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlueskript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion in der EcoRI-Schnittstelle des polylinkers enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

### Ausführungsbeispiel 2

#### Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pPCS (DSM 8879)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 1 erhaltenen E.coli-Klon wurde das Plasmid pPCS (Fig. 1) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 1891 bp lang. Die Nukleotidsequenz (Seq. ID No. 1) ist oben angegeben.

### Ausführungsbeispiel 3

#### Konstruktion des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pPCS wurde durch BamHI/SalI-Verdau ein ca. 1,9 kb langes DNA-Fragment isoliert, das die oben angegebene Sequenz (Seq. ID No. 1) aufweist und die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffeln enthält. Dieses DNA-Fragment wurde in den mit BamHI/SalI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) kloniert. Der Vektor pBinAR ist ein Derivat des binären Vektors Bin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12:8711-8721).

Das resultierende Plasmid wurde pKS-CSa genannt und ist in Fig. 2 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 2) :

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B umfaßt die proteinkodierende Region der Citrat-Synthase aus Kartoffeln. Diese wurde wie oben beschrieben als BamHI/SalI-Fragment aus pPCS isoliert und in *anti-sense* Orientierung an den Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids pKS-CSa beträgt ca. 12,9 kb.

Der Vektor pKS-CSa wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation in Kartoffeln transferiert. Intakte Pflanzen wurden aus den transformierten Zellen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen in verschiedenem Ausmaß eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA (siehe Fig. 6). Es wurden 2 µg poly(A<sup>+</sup>)-mRNA in einem Northern-Blot Experiment mit der Sonde für Citrat-Synthase aus Kartoffeln hybridisiert. Das in Wildtyp-Pflanzen auftretende, für Citrat-Synthase kodierende Transkript (Spuren 1 bis 3) ist kürzer als das Transkript der anti-sense-Expressionskassette (siehe beispielsweise Spur 6), wodurch sich erkennen läßt, daß es in den verschiedenen transgenen Pflanzen zu einer unterschiedlich starken Reduktion der endogenen Transkripte gekommen ist.

Transgene Kartoffelpflanzen, die eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA aufwiesen, wurden im Hinblick

auf die Citrat-Synthaseaktivität in verschiedenen Geweben untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Blättern, Knollen und aus Knollen isolierten Mitochondrien sind in Fig. 7 dargestellt.

Die Verringerung der Citrat-Synthaseaktivität hat in den transgenen Pflanzen einen erheblichen Effekt auf die Blütenbildung, dessen Ausprägung vom Ausmaß der Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität abhängt.

Transformierte Kartoffelpflanzen, bei denen die Citrat-Synthaseaktivität stark verringert ist (vergleiche Fig. 7), sind in ihrer Blütenbildung stark bis vollkommen inhibiert (siehe Fig. 8).

Pflanzen bei denen die Citrat-Synthaseaktivität nur mäßig verringert ist, zeigen eine verspätete Blütenbildung und setzen weniger Blüten an oder bilden nur Blütenknospen, die sich nicht zu funktionsfähigen Blüten weiterentwickeln.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es daher auch möglich Pflanzen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herzustellen, bei denen die Citratsynthase-Aktivität in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert ist, so daß aus den transgenen Pflanzen solche ausgewählt werden können, die den gewünschten Phänotyp, beispielsweise eine vollkommene Inhibition der Blütenbildung oder eine Blütenbildung, die im Vergleich zu untransformierten Pflanzen verspätet einsetzt, aufweisen.

#### Ausführungsbeispiel 4

##### Klonierung einer cDNA kodierend für Citrat-Synthase aus Tabak (*Nicotiana tabacum*)

Für die Identifizierung einer cDNA aus *Nicotiana tabacum*, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde eine cDNA-Bank von Blattgewebe von Tabak, wie in Ausführungsbeispiel 1 für Kartoffel beschrieben, hergestellt. 250 000 Plaques dieser cDNA-Bank wurden mit Hilfe einer radioaktiven DNA-Sonde nach Sequenzen durchgemustert, die für Citrat-Synthase kodieren. Als Sonde wurde die cDNA aus *Solanum tuberosum* verwendet, die für Citrat-Synthase kodiert (1.4 kb NruI/HindII-Fragment aus pPCS; siehe Ausführungsbeispiel 1 und 2, sowie Seq ID No. 1). Die Identifizierung und Isolierung von

Phagenklonen, die mit der verwendeten radioaktiven DNA-Probe hybridisierten, erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit dem Unterschied, daß die Plaques auf Nylonmembranen übertragen wurden und für die Prähyridisierung und die Hybridisierung folgender Puffer verwendet wurde: 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 10 mM EDTA, 7% SDS, 10 µg BSA.

Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen *E.coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

#### Ausführungsbeispiel 5

##### Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pTCS (DSM 9357)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 4 erhaltenen *E.coli*-Klon wurde das Plasmid pTCS (Fig. 4) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 1747 bp lang. Die Nukleotidsequenz ist oben unter Seq ID No. 3 angegeben.

#### Ausführungsbeispiel 6

##### Klonierung einer cDNA kodierend für Citrat-Synthase aus Zuckerrübe (*Beta vulgaris L.*)

Für die Identifizierung einer cDNA aus Zuckerrübe, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde eine cDNA-Bank von Blattgewebe von Zuckerrüben (*Beta vulgaris L.* Zuchlinie 5S 0026) hergestellt indem poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Blattgewebe isoliert und diese für die cDNA-Synthese mit Hilfe kommerzieller Kits (Pharmacia LKB, Stratagene) nach der Methode von Gubler und Hoffmann (1983, Gene 25:263-269) verwendet wurde. 250 000 Plaques einer derartigen cDNA-Bank wurden wie in Ausführungsbeispiel 4 beschrieben mit Hilfe radioaktiver DNA-Sonden nach Sequenzen durchgemustert, die für Citrat-Synthase kodieren. Als Sonde wurde eine Mischung aus der

radioaktiv markierten cDNA aus *Solanum tuberosum*, die für Citrat-Synthase kodiert (siehe Ausführungsbeispiel 1, 2 und 4, sowie Seq ID No. 1), und der radioaktiv markierten cDNA aus *Nicotiana tabacum*, die für Citrat-Synthase kodiert (siehe Ausführungsbeispiel 4 und 5, sowie Seq ID No. 3), verwendet. Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, die mit der verwendeten radioaktiven DNA-Probe hybridisierten, erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben.

Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen *E.coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

#### Ausführungsbeispiel 7

##### Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSBCS (DSM 9358)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 6 erhaltenen *E.coli*-Klon wurde das Plasmid pSBCS (Fig. 3) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 1551 bp lang. Die Nukleotidsequenz ist oben unter Seq ID No. 2 angegeben.

#### Ausführungsbeispiel 8

##### Konstruktion des Plasmids TCSAS (DSM 9359) und Einführung des Plasmids in das Genom von Tabakpflanzen

Aus dem Plasmid pTCS wurde durch BamHI/SalI-Verdau ein ca. 1.800 kb langes DNA-Fragment isoliert, das die oben angegebene Sequenz (Seq ID No. 3) aufweist und die kodierende Region für Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* enthält. Dieses DNA-Fragment wurde in den mit BamHI/SalI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) kloniert. Der Vektor pBinAR ist ein Derivat des binären Vektors Bin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12:8711-8721).

Das resultierende Plasmid wurde TCSAS genannt und ist in Fig. 5 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 5) :

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen die proteinkodierende Region der Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum*. Diese wurde wie oben beschrieben als BamHI/SalI-Fragment aus pTCS isoliert und in *anti-sense* Orientierung an den Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids TCSAS beträgt ca. 12,75 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Tabakpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Tabakpflanzen eine Verringerung der intrazellulären Citrat-Synthase-Aktivität.

#### Ausführungsbeispiel 9

Konstruktion des Plasmids pHs-mCS und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Zur Konstruktion des Plasmids pHs-mCS wurde zunächst in einen pUC18-Vektor eine DNA-Sequenz integriert, die für die mitochondriale Target-Sequenz der Matrix Processing Peptidase (MPP) kodiert. Diese Sequenz wurde mittels der Polymerase-

Kettenreaktion (PCR) aus einem pBluescript-Plasmid, das die cDNA-Sequenz der MPP enthielt (Braun et al., 1992, EMBO J. 11:3219-3227) isoliert unter Verwendung folgender Oligonukleotide:

Oligo a: 5'-GATC GGT ACC ATG TAC AGA TGC GCA TCG TCT-3'

und

Oligo b: 5'-GTAC GGA TCC CTT GGT TGC AAC AGC AGC TGA-3'

Das resultierende DNA-Fragment umfaßte die Nukleotide 99 bis 397 der in Braun et al. (1992, EMBO J. 11:3219-3227) dargestellten Sequenz, die für die Matrix Processing Peptidase kodiert. Durch das Oligonukleotid a wurde am 5'-Ende der Sequenz eine Asp 718-Schnittstelle eingeführt. Das Oligonukleotid b führte am 3'-Ende der Sequenz eine BamH I-Schnittstelle ein.

Das aus der PCR erhaltene DNA-Fragment wurde mit Asp718 und BamH I geschnitten und in den mit Asp718 und BamH I geschnittenen Vektor pUC18 kloniert. Der resultierende Vektor wurde pMTP genannt.

In das Plasmid pMTP wurde hinter die mitochondriale Targetsequenz im selben Leserahmen eine DNA-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* kloniert, die für eine Citrat-Synthase kodiert. Hierfür wurde nach gängigen Methoden genomische DNA aus Hefe präpariert und mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide

Oligo c: 5'-CTAG GGA TCC ATG TCA GCG ATA TTA TCA ACA ACT  
AGC AAA AGT-3'

und

Oligo d: 5'-GATT GGA TCC TTA GTT CTT ACT TTC GAT TTT CTT  
TAC CAA CTC-3'

ein 1443 bp langes Fragment isoliert, das die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Hefe umfaßt. Die Sequenz umfaßt insbesondere die Nukleotide 376-1818 der in Suissa et al. (1984, EMBO J. 3:1773-1781) dargestellten Sequenz. Die verwendeten Oligonukleotide

führen an beiden Seiten der amplifizierten DNA-Sequenz eine BamH I-Schnittstelle ein. Das resultierende DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease BamH I geschnitten, anschließend in den mit BamH I geschnittenen Vektor pMTP ligiert und in *E.coli*-Zellen transformiert. Es wurde durch Bestimmung des Restriktionsmusters ein Klon ausgewählt, bei dem die Insertion des PCR-Fragmentes derartig erfolgte, daß die kodierende Region in sense-Orientierung an die mitochondriale Targeting-Sequenz geknüpft war, d.h. daß das 5'-Ende der kodierenden Region an das 3'-Ende der Targeting-Sequenz geknüpft war. Das resultierende Plasmid wurde pMTP-YCS genannt.

Aus diesem Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Asp718 und Xba I ein ca. 1550 bp langes Fragment isoliert, das die mitochondriale Targetsequenz und die kodierende Region für Citratsynthase aus Hefe umfaßt. Dieses Fragment wurde in den mit Asp718 und Xba I geschnittenen binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Sci. 66: 221-230) ligiert. Das resultierende Plasmid pHs-mCS ist in Fig. 9 dargestellt. Bei dem binären Vektor pBinAR handelt es sich um ein Derivat des binären Vektors Bin19. Der Vektor enthält einen 35S-Promotor und ein Terminationssignal für die Transkription, zwischen denen ein Polylinker lokalisiert ist, der für die Insertion verschiedener DNA-Sequenzen verwendet werden kann.

Durch die Insertion des DNA-Fragmentes, das für Citrat-Synthase aus Hefe mit einer mitochondrialen Targetsequenz am N-Terminus kodiert, entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B, C und D aufgebaut ist (Fig. 9) :

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B enthält ein 99 bp lange DNA-Fragment, das für die mitochondriale Targesequenz der Matrix Processing Peptidase kodiert (Nukleotide 99-397 der in Braun et al., 1992, EMBO J. 11:3219-3227, dargestellten Sequenz)

Fragment C enthält die kodierende Region für Citrat-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Nukleotide 376-1818 der in Suissa et al., 1984 EMBO J. 3:1773-1781, dargestellten Sequenz) in *sense*-Orientierung und im selben Leserahmen wie die Targetsequenz an das 3'-Ende der Targetsequenz fusioniert.

Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids pHs-mCS beträgt ca. 12,5 kb.

Von dieser Expressionskassette wird von dem 35S-Promotor ein Transkript abgelesen wird, das für eine Citratsynthase aus Hefe kodiert und an seinem N-Terminus eine Aminosäuresequenz umfaßt, die den Transport des Proteins in die Mitochondrien gewährleistet.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Expression der Hefe-Citratsynthase in den Zellen. Dies ließ sich mit Hilfe von Western-Blot-Analysen unter Verwendung polyklonaler Antikörper, die spezifisch die Citrat-Synthase aus Hefe erkennen, nachweisen.

Die transformierten Kartoffelpflanzen, die eine hohe Expression der Citrat-Synthase aus Hefe zeigten, wiesen im Verhältnis zu nicht transformierten Kartoffelpflanzen ein verändertes Blühverhalten auf. Es war zum einen zu beobachten, daß transformierte Pflanzen wesentlich früher mit der Blütenbildung beginnen (unter Gewächshausbedingungen im Durchschnitt 2-4 Wochen) und im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen mehr Blüten ansetzen.

SEQ ID NO.: 1  
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein  
 SEQUENZLÄNGE: 1891 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang  
 TOPOLOGIE: linear  
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Solanum tuberosum  
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptKS  
 MERKMALE: von Nukleotid 73-1485 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

TT TTTCGTTCCA TCAGCCTACT	22
TGAGATGTAT TCCCCACTGGT AAAAGTTAAC TTTTTTGATT TTCCGCGAGCA	72
ATG GTG TTC TAC CGT AGC GTT TCG TTG CTG TCA AAG CTC CGC TCT	117
Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser	
1 5 10 15	
CGA GCG GTC CAA CAG TCA AAT GTT AGC AAT TCT GTG CGC TGG CTT	162
Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu	
20 25 30	
CAA GTC CAA ACC TCT TCC GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG GTA	207
Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val	
35 40 45	
CAA GAA TTG ATT CCT GAA CAA CAG GAT CGC CTG AAA AAG ATC AAG	252
Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys	
50 55 60	
TCA GAT ATG AAA GGT TCA ATT GGG AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT	297
Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val	
65 70 75	

CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG AAA CCT CAT	342	
Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His		
80	85	90
TAC CTT GAC CCT GAT GAG GGA ATT CGC TTC CCG GGG TTG TCT ATA	387	
Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile		
95	100	105
CCT GAA TGC CAA AAG GTA TTA CCT GCA GCA AAG CCT GGG GGT GAG	432	
Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu		
110	115	120
CCC TTG CCT GAA GGT CTT CTC TGG CTT CTT TTA ACA GGA AAG GTG	477	
Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Thr Gly Lys Val		
125	130	135
CCA TCA AAA GAG CAA GTG AAT TCA ATT GTC TCA GGA ATT GCA GAG	522	
Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu		
140	145	150
TCG GGC ATC ATA TCC CTG ATC ATC ATG TAT ACA ACT ATT GAT GCC	567	
Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala		
155	160	165
TTA CCA GTC ACA GCT CAT CCA ATG ACC CAG TTT GCT ACT GGA GTC	612	
Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val		
170	175	180
ATG GCT CTT CAG GTT CAA AGT GAA TTT CAA AAG GCA TAC GAG AAA	657	
Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys		
185	190	195
GGG ATT CAC AAA TCA AAG TAT TGG GAA CCA ACA TAT GAG GAT TCC	702	
Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser		
200	205	210

ATG AAT CTG ATT GCT CAA GTT CCA CTT GTT GCT GCT TAT GTT TAT	747	
Met Asn Leu Ile Ala Gln Val Pro Leu Val Ala Ala Tyr Val Tyr		
215	220	225
CGC AGG ATG TAC AAG AAT GGT GAC ACT ATA CCT AAG GAT GAA TCC	792	
Arg Arg Met Tyr Lys Asn Gly Asp Thr Ile Pro Lys Asp Glu Ser		
230	235	240
CTG GAT TAT GGT GCA AAT TTT GCT CAC ATG CTT GGT TTC AGT AGC	837	
Leu Asp Tyr Gly Ala Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Ser Ser		
245	250	255
TCT GAA ATG CAT GAA CTT CTT ATG AGG CTC TAT GTA ACA ATA CAC	882	
Ser Glu Met His Glu Leu Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His		
260	265	270
AGT GAT CAT GAA GGT GGT AAT GTC AGT GCT CAC ACC GGT CAC TTG	927	
Ser Asp His Glu Gly Gly Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu		
275	280	285
GTT GCT AGT GCT TTG TCT GAT CCT TAC CTC TCC TTT GCT GCT GCT	972	
Val Ala Ser Ala Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala		
290	295	300
TTG AAT GGT TTA GCC GGA CCA CTT CAT GGT TTA GCC AAT CAG GAA	1017	
Leu Asn Gly Leu Ala Gly Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu		
305	310	315
GTT TTG CTA TGG ATA AAA TCT GTT GTA GAA GAA TGT GGG GAG AAC	1062	
Val Leu Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn		
320	325	330
ATT TCC AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAT GTT TGG AAA ACA TTG AAC	1107	
Ile Ser Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn		
335	340	345

AGT GGC AAG GTT GTC CCT GGT TTT GGA CAT GGA GTT CTG CGA AAG	1152	
Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys		
350	355	360
ACT GTA CCA AGA TAT ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT ATG AAG CAT	1197	
Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His		
365	370	375
TTG CCT GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT TCA AAA CTC TAC GAA	1242	
Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu		
380	385	390
GTT TTC CTC CTG TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAA CCT TGG	1287	
Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp		
395	400	405
CCA AAT GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT	1332	
Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly		
410	415	420
TTA ACT GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGC GTA TCA AGA	1377	
Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg		
425	430	435
GCT CTT GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA	1422	
Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly		
440	445	450
TTG CCG CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG	1467	
Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu		
455	460	465
AAC CAG TGC AAG AAA GCA TGAATTGTTT GAAATCTCGC GAGCATAAAA	1515	
Asn Gln Cys Lys Lys Ala		
470		
CACAATGTAT AATCTCTATG AATAATTGCT TGACAAAGCA CTCCTTTCTT	1565	

GGGGGACAAG ATAGGTCGGC CCTTCAATGG GTTAACGAAC TTCAGTTCAA	1615
ACTTCACTGA ATTTGTGTGA ATTGTATGGT TTCTCGAGAC TTGTCCTGAA	1665
TTTTGAACCTT AGTCTAGTGG ATTCAATTCTT CTTCATTCCG AATTCCCTCAC	1715
ACGCTGATCC AGCATGTAAA AATTAATAGG TCAATGCTAT TAATCGCGTT	1765
CTTGGTTGCC ATTAGACTTG TGAATGACTT CCTTTGCTGG AAAGTTAGTA	1815
ATCGGCTGAT TCACGCAATA AACTGCAATT GTGTAGTTTC TTAAATTTGC	1865
TAATTCTTAT TTGATGATAT TATGAA 1891	

SEQ ID NO.: 2  
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein  
 SEQUENZLÄNGE: 1551 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang  
 TOPOLOGIE: linear  
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Beta vulgaris L.  
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptSK  
 MERKMALE: von Nukleotid 1-1313 kodierende Region  
 EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

TCC	TCT	AAC	CTT	GAC	CTT	CGT	TCA	GAG	TTA	CAA	GAA	CTG	ATT	CCT	45
Ser	Ser	Asn	Leu	Asp	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Pro	
1				5					10				15		
GAA	CAA	CAG	GAA	CGA	CTG	AAG	AAG	ATA	AAG	AAA	GAA	TTT	GGA	AGT	90
Glu	Gln	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	
20					25						30				
TTC	CAG	CTG	GGG	AAT	ATC	AAT	GTT	GAC	ATG	GTA	TTG	GGC	GGA	ATG	135
Phe	Gln	Leu	Gly	Asn	Ile	Asn	Val	Asp	Met	Val	Leu	Gly	Gly	Met	
35					40						45				
AGA	GGA	ATG	ACT	GGT	TTA	CTT	TGG	GAG	ACT	TCC	TTA	CTC	GAC	CCA	180
Arg	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Leu	Trp	Glu	Thr	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	
50					55						60				
GAA	GAG	GGT	ATC	CGG	TTC	AGG	GGT	TTT	TCT	ATA	CCT	GAA	TGC	CAG	225
Glu	Glu	Gly	Ile	Arg	Phe	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile	Pro	Glu	Cys	Gln	
65					70						75				
AAA	CTT	TTA	CCC	GCT	GCA	AGT	GCT	GGT	GCA	GAG	CCA	TTG	CCT	GAA	270
Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Leu	Pro	Glu	
80					85						90				
GGT	CTT	CTT	TGG	CTT	CTT	TTA	ACC	GGA	AAG	GTT	CCT	AGC	AAA	GAG	315
Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Glu	
95					100						105				
CAA	GTA	GAT	GCT	CTA	TCA	GCA	GAT	TTA	CGA	AAA	CGT	GCT	TCT	ATC	360
Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Leu	Arg	Lys	Arg	Ala	Ser	Ile	
110					115						120				
CCA	GAC	CAT	GTG	TAC	AAA	ACA	ATT	GAT	GCT	CTA	CCT	ATT	ACG	GCT	405
Pro	Asp	His	Val	Tyr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Ile	Thr	Ala	

125	130	135	
CAT CCA ATG ACT CAG TTT TGC ACT GGT GTT ATG GCC TTA CAG ACT His Pro Met Thr Gln Phe Cys Thr Gly Val Met Ala Leu Gln Thr 140 145 150			450
CGA AGC GAA TTT CAG AAG GCA TAT GAG AAA GGG ATC CAT AAG TCA Arg Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys Gly Ile His Lys Ser 155 160 165			495
AAG TTT TGG GAG CCA ACA TAT GAG GAC TGC CTT AGT TTG ATT GCT Lys Phe Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Cys Leu Ser Leu Ile Ala 170 175 180			540
CAA GTT CCT GTT GCA GCT TAT GTT TAT CGG AGG ATG TAT AAG Gln Val Pro Val Val Ala Ala Tyr Val Tyr Arg Arg Met Tyr Lys 185 190 195			585
AAT GGA CAA GTA ATA CCG CTG GAT GAC TCC CTT GAT TAT GGT GGA Asn Gly Gln Val Ile Pro Leu Asp Asp Ser Leu Asp Tyr Gly Gly 200 205 210			630
AAT TTC GCA CAC ATG TTG GGA TTT GAT AGC CCT CAG ATG CTT GAG Asn Phe Ala His Met Leu Gly Phe Asp Ser Pro Gln Met Leu Glu 215 220 225			675
CTG ATG CGC CTT TAT GTC ACA ATT CAC AGT GAT CAT GAG GGT GGA Leu Met Arg Leu Tyr Val Thr Ile His Ser Asp His Glu Gly Gly 230 235 240			720
AAT GTT AGT GCA CAC ACT GGC CAT TTG GTG GGT AGT CCA CTT TCA Asn Val Ser Ala His Thr Gly His Leu Val Gly Ser Pro Leu Ser 245 250 255			765
GAT CCT TAT TTG TCA TTT GCA GCA GCA TTA AAT GGT TTG GCT GGG Asp Pro Tyr Leu Ser Phe Ala Ala Ala Leu Asn Gly Leu Ala Gly 260 265 270			810
CCA CTC CAT GGA TTA GCC AAC CAG GAA GTC CTG CTG TGG ATT AAA Pro Leu His Gly Leu Ala Asn Gln Glu Val Leu Leu Trp Ile Lys 275 280 285			855
TCA GTT GTT GAT GAA TGT GGA GAG AAC ATC TCG ACA GAG CAG TTG Ser Val Val Asp Glu Cys Gly Glu Asn Ile Ser Thr Glu Gln Leu 290 295 300			900
AAA GAT TAT GTT TGG AAG ACA CTA AAC AGT GGC AAG GTT GTA CCT Lys Asp Tyr Val Trp Lys Thr Leu Asn Ser Gly Lys Val Val Pro 305 310 315			945
GGA TTT GGT CTA GGA GTA TTG CGG AAG ACA GAT CCA AGA TAC ACA Gly Phe Gly Leu Gly Val Leu Arg Lys Thr Asp Pro Arg Tyr Thr 320 325 330			990
TGC CAA AGA GAA TTT GCG TTG AAG CAC TTG CCT GAT GAC CCA TTT Cys Gln Arg Glu Phe Ala Leu Lys His Leu Pro Asp Asp Pro Phe 335 340 345			1035

TTT CAA TTG GTG TCA AAG TTG TAT GAA GTG GTG CCT CCT ATT CTA	1080
Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu Val Val Pro Pro Ile Leu	
350 355 360	
TTA GAG CTT GGA AAG GTA AAG AAT CCA TGG CCT AAT GTT GAT GCT	1125
Leu Glu Leu Gly Lys Val Lys Asn Pro Trp Pro Asn Val Asp Ala	
365 370 375	
CAT AGT GGA GTT TTG CTG AAC CAC TAT GGT TTG ACA GAA GCA AGA	1170
His Ser Gly Val Leu Leu Asn His Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Arg	
380 385 390	
TAC TAT ACG GTT TTG TTT GGG GTA TCA AGG AGT CTT GGA ATA TGC	1215
Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg Ser Leu Gly Ile Cys	
395 400 405	
TCA CAG CTT ATA TGG GAC CGA GCT CTT GGC TTG CCG CTA GAG AGG	1260
Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly Leu Pro Leu Glu Arg	
410 415 420	
CCA AAG AGT GTC ACT ATG GAA TGG CTT GAA AAG TTT TGT AAA AGA	1305
Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu Lys Phe Cys Lys Arg	
425 430 435	
AGA GCA TAACATTGAT GACATATCAA CTCACTGTTG TTCTTTGTCG	1351
Arg Ala	
AATCTACAAT AATATAGTTT GAGGGACAAG AAAGAATTTC ATTTTCGGAG	1401
ATGAGATAAG CGAGGACTCA GAAACATAGT TTTCTTTGTC TCTTGCTGAG	1451
GTTCGCGTTT TATATATTTC ACTTGTAAT ATATTGTATG GTTCCTTGAT	1501
CAAAACATGA GATAAAGAGT TTTCATAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	1551

SEQ ID NO.: 3  
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein  
 SEQUENZLÄNGE: 1747 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang  
 TOPOLOGIE: linear  
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Nicotiana tabacum  
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptSK  
 MERKMALE: von Nukleotid 70-1476 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

GCTCTTGGGA TCTATTCCT CTCTCTATT CTCCCTAGGT AAAAGTTAAT	50
TTGTTGATTT TTGCGAGCC	69
ATG GTG TTC TAT CGC GGC GTT TCT CTG CTG TCA AAG CTG CGT TCT Met Val Phe Tyr Arg Gly Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser 1 5 10 15	114
CGA GCG GTC CAA CAG ACA AAT CTT AGC AAC TCT GTG CGG TGG CTT Arg Ala Val Gln Gln Thr Asn Leu Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu 20 25 30	159
CAA GTC CAA ACC TCT TCT GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG CAA Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Gln 35 40 45	204
GAA TTG ATT CCA GAA CAA CAG GAT CGC CTA AAG AAG CTC AAG TCA Glu Leu Ile Pro Glu Gln Gln Asp Arg Leu Lys Lys Leu Lys Ser 50 55 60	249
GAG CAT GGA AAG GTT CAA TTG GGA AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT Glu His Gly Lys Val Gln Leu Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val 65 70 75	294
CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG GAA ACC TCA Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Glu Thr Ser 80 85 90	339
TTA CTT GAC CCC GAT GAA GGA ATT CGC TTT CGG GGC TTG TCT ATC Leu Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile 95 100 105	384

TAT	GAA	TGC	CAA	AAG	GTA	TTA	CCT	GCA	GCA	AAG	CCT	GGG	GGA	GAG	429
Tyr	Glu	Cys	Gln	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	
					110					115				120	
CCC	TTG	CCT	GAA	GGT	CTT	CTC	TGG	CTT	CTT	TTA	ACA	GGA	AAG	GTG	474
Pro	Leu	Pro	Glu	Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Val	
					125				130				135		
CCA	TCA	AAA	GAG	CAA	GTG	GAT	TCA	TTG	TCT	CAG	GAA	TTG	CGA	AGT	519
Pro	Ser	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Gl	Leu	Arg	Ser	
					140				145				150		
CGT	GCT	ACT	GTC	CCC	GAT	CAT	GTA	TAC	AAA	ACT	ATT	GAT	GCC	TTA	564
Arg	Ala	Thr	Val	Pro	Asp	His	Val	Tyr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ala	Leu	
					155				160				165		
CCA	GTC	ACA	GCT	CAT	CCA	ATG	ACT	CAG	TTT	GCT	ACT	GGA	GTC	ATG	609
Pro	Val	Thr	Ala	His	Pro	Met	Thr	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Met	
					170				175				180		
GCT	CTT	CAG	GTT	CAA	AGT	GAA	TTT	CAA	AAG	GCA	TAT	GAG	AAA	GGG	654
Ala	Leu	Gln	Val	Gln	Ser	Glu	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Glu	Lys	Gly	
					185				190				195		
ATT	CAC	AAA	TCA	AAG	TTA	TGG	GAA	CCG	ACA	TAT	GAG	GAT	TCC	ATG	699
Ile	His	Lys	Ser	Lys	Leu	Trp	Glu	Pro	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Met	
					200				205				210		
AGT	TTG	ATT	GCT	CAA	GTT	CCA	CTT	GTT	GCT	GCT	TAT	GTT	TAT	CGC	744
Ser	Leu	Ile	Ala	Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg	
					215				220				225		
AGG	ATG	TAC	AAG	AAC	GGC	AAC	ACT	ATA	CCT	AAG	GAT	GAC	TCA	CTG	789
Arg	Met	Tyr	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Ile	Pro	Lys	Asp	Asp	Ser	Leu	
					230				235				240		
GAT	TAT	GGT	GCA	AAT	TTT	GCT	CAC	ATG	CTT	GGT	TTC	AGT	AGC	TCT	834
Asp	Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Ala	His	Met	Leu	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	
					245				250				255		
GAC	ATG	CAT	GAG	CTT	ATG	AAG	CTC	TAT	GTC	ACG	ATA	CAC	AGT	GAT	879
Asp	Met	His	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Tyr	Val	Thr	Ile	His	Ser	Asp	
					260				265				270		
CAT	GAA	GGT	GGT	AAC	GTC	AGT	GCT	CAC	ACA	GGT	CAC	TTG	GTT	GCT	924
His	Glu	Gly	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	His	Thr	Gly	His	Leu	Val	Ala	
					275				280				285		
AGT	GCT	TTG	TCA	GAC	CCT	TAC	CTC	TCC	TTC	GCT	GCT	GCT	TTG	AAT	969
Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Pro	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	
					290				295				300		
GGT	TGG	TTA	GCT	GGA	CCA	CTT	CAT	GGT	TTA	GCC	AAT	CAG	GAA	GTT	1014
Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	His	Gly	Leu	Ala	Asn	Gln	Glu	Val	Leu	
					305				310				315		

TTG CTA ATC AAA TCT GTT GTA GAG GAG TGT GGG GAG AAC ATT TCC	1059
Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn Ile Ser	
320 325 330	
AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAC GCT TGG AAA ACA TTG AAA AGT GGC	1104
Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Ala Trp Lys Thr Leu Lys Ser Gly	
335 340 345	
AAG GTT GTC CCT GGT TTC GGA CAT GGA GTT CTG CGC AAG ACT GAT	1149
Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys Thr Asp	
350 355 360	
CCA AGA TAC ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT TTG AAG CAT TTG CCT	1194
Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Leu Lys His Leu Pro	
365 370 375	
GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT GCA AAA CTC TAC GAA GTG TTC	1239
Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ala Lys Leu Tyr Glu Val Phe	
380 385 390	
CTC CAA TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAC CCT TGG CCA AAT	1284
Leu Gln Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Asn Pro Trp Pro Asn	
395 400 405	
GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT TTA ACT	1329
Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly Leu Thr	
410 415 420	
GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGT GTA TCA AGA GCT CTT	1374
Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg Ala Leu	
425 430 435	
GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA TTG CCA	1419
Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly Leu Pro	
440 445 450	
CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG AAC CAT	1464
Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu Asn His	
455 460 465	
TGC AAG AAA GCA TGATTTGTTA AAAGCACAAT GTAAAATCTT TATGAATAAT	1516
Cys Lys Lys Ala	
TGCTTGAGAA AGCAGTTTT TCTTGGAGCC AAGGTAGGTC GCATTAGGAT	1566
GTTCAATCGAT TGGCTTAGTA CGGTTTGAA AGATTTGGT TGTGTATTTT	1616
CAGTTTCGGT TTTAAAAATG TTATACCAAT ACCTTATCGA TATAAATTCA	1666
ATATGATTG ATTTTTACT TTTGTTGAA AAAAAAAACA AAAAAAAA	1716
AAAAAAAAAA AAAGC	1731

Patentansprüche

1. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase gehemmt wird.
2. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.
3. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) in das Genom einer Pflanzenzelle eine DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
  - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
  - c) die Expression endogener Citratsynthase-Gene aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
  - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
4. Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
  - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
  - c) die Expression der Citratsynthase aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
  - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 4, worin die verwendete anti-sense-DNA in sense-Orientierung eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder eines Teiles davon kodiert, wobei die verwendete kodierende Sequenz geeignet ist, um die Expression eines endogenen Citrat-Synthasegens zu inhibieren.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 4, worin die DNA in sense-Orientierung die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt oder Derivate davon, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet sind, wobei diese Teile oder Derivate geeignet sind, um die Expression eines endogenen Citrat-Synthasegens zu inhibieren.
7. Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes DNA-Molekül in Zellen eingeführt wird und es dadurch in diesen Zellen zu einer zusätzlichen Expression eines Proteins mit der enzymatischen Aktivität einer Citratsynthase kommt, was in transformierten Pflanzen zu einer vorzeitigen und verstärkten Blütenbildung führt.
8. Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die homologen oder heterologen Ursprungs ist und die für ein Protein mit Citratsynthase-Aktivität kodiert,
  - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
  - c) es aufgrund dieser Expression zu einer Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den transgenen Zellen kommt und
  - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, worin die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert oder für einen Teil dieser Sequenzen, wobei diese Teile Citrat-Synthaseaktivität aufweisen.
10. Verfahren gemäß Anspruch 8, worin die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt, wobei dieser Teil lang genug ist, um für ein Protein zu kodieren, das Citrat-Synthase-Aktivität aufweist.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, worin die für eine Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt.
12. DNA-Sequenzen aus einer Pflanze der Familie der Solanaceae oder der Familie der Chenopodiaceae, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Integration in ein pflanzliches Genom die Bildung von Transkripten erlaubt, durch die eine endogene Citrat-Synthaseaktivität unterdrückt werden kann, oder die Bildung von Transkripten erlaubt, durch die die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen erhöht werden kann.
13. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies *Solanum tuberosum* stammen.
14. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies *Nicotiana tabacum* stammen.
15. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies Zuckerrübe stammen.
16. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 12 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 1 angegebene Nukleotidabfolge hat.
17. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 12 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidabfolge hat.
18. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 12 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 2 angegebene Nukleotidabfolge hat.
19. Ein Plasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüchen 12 bis 18 enthält.
20. Plasmid pPCS, das unter der DSM-Nr. 8879 hinterlegt wurde.

21. Plasmid pKS-CSa, das unter der DSM-Nr. 8880 hinterlegt wurde.
22. Plasmid pSBCS, das unter der DSM-Nr. 9358 hinterlegt wurde.
23. Plasmid pTCS, das unter der DSM-Nr. 9357 hinterlegt wurde.
24. Plasmid TCSAS, das unter der DSM-Nr. 9359 hinterlegt wurde.
25. Die Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 20 bis 24 oder Derivate oder Teile davon zur Transformation pro- und eukaryontischer Zellen.
26. Bakterien, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18.
27. Bakterien enthaltend Plasmide gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 24.
28. Transgene Pflanzen, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18 als Bestandteil rekombinanter DNA.
29. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 28 dadurch gekennzeichnet, daß ihre Citrat-Synthaseaktivität durch Anwesenheit einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18, die Bestandteil einer rekombinanten DNA ist, verändert ist.
30. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nutzpflanze ist.
31. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Kartoffel ist.
32. Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) kodieren, zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen.
33. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18 in Kombination mit Steuerelementen für eine Expression in pro- und eukaryontischen Zellen.

34. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 18 zur Expression einer nicht translatierbaren mRNA, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase in den Zellen verhindert.
35. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß den Ansprüchen 16, 17 oder 18 zur Isolierung homologer Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.
36. Verwendung von DNA-Sequenzen, die für Proteine mit der enzymatischen Aktivität einer Citratsynthase kodieren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen.

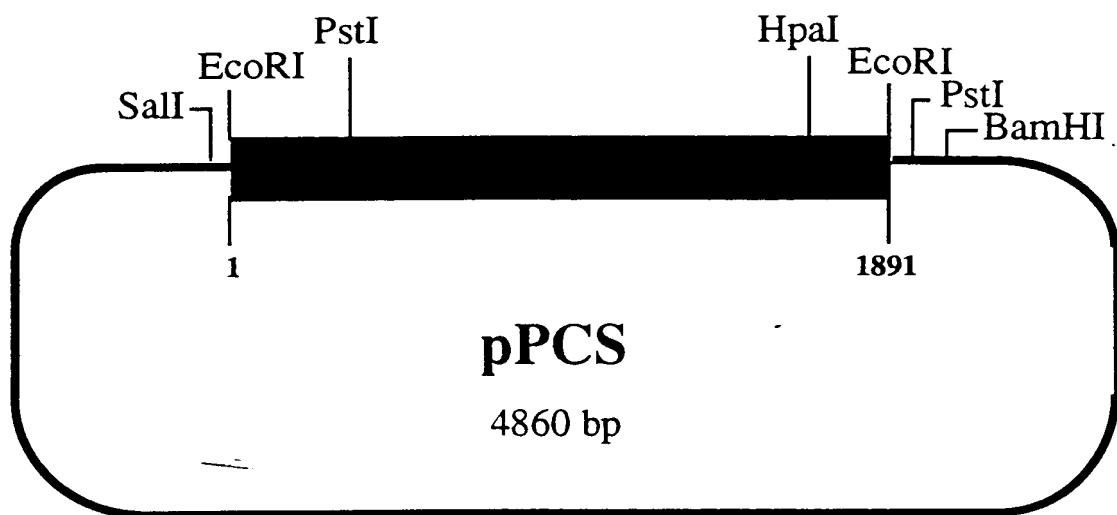


Fig. 1

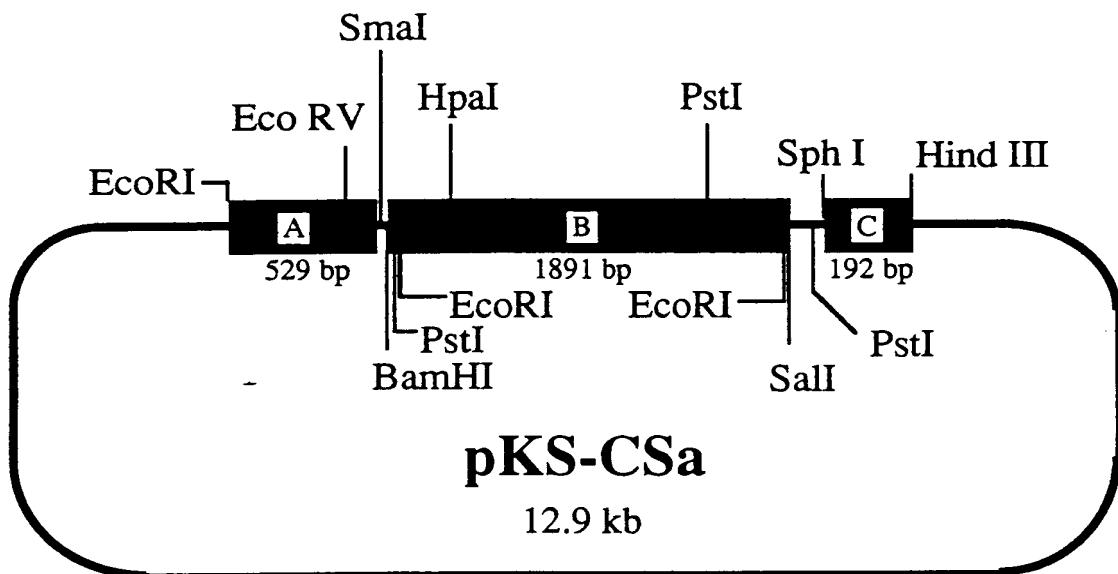


Fig. 2

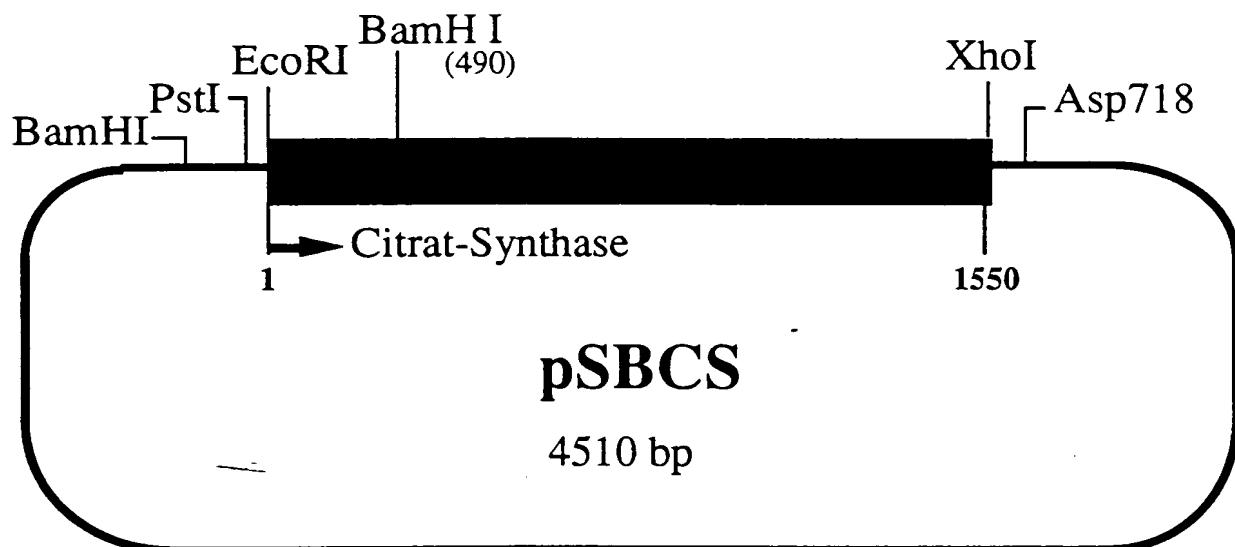


Fig. 3

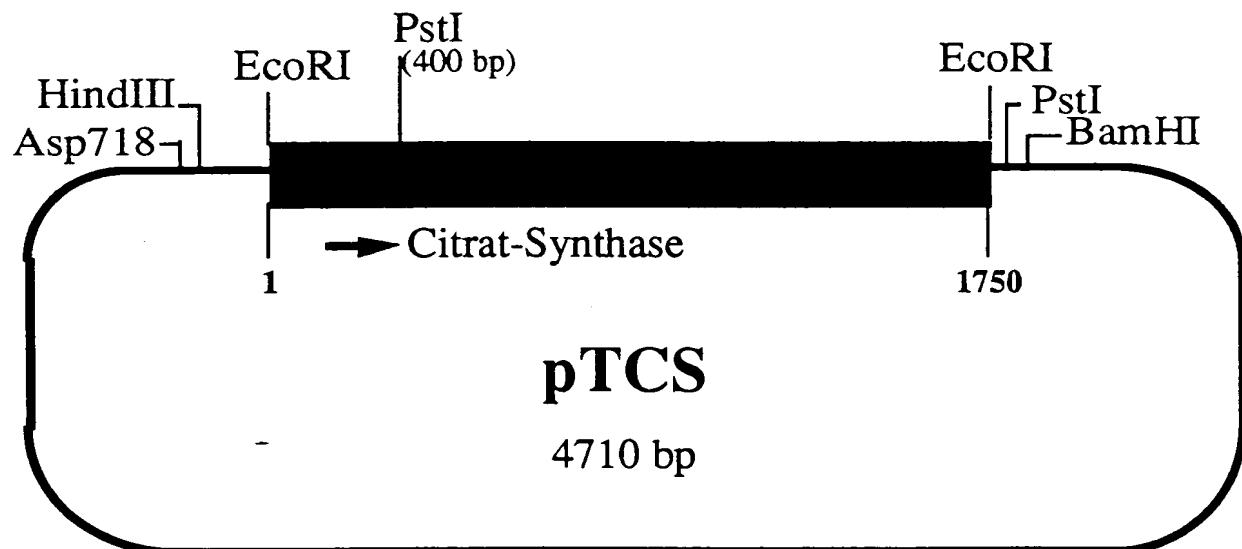


Fig. 4

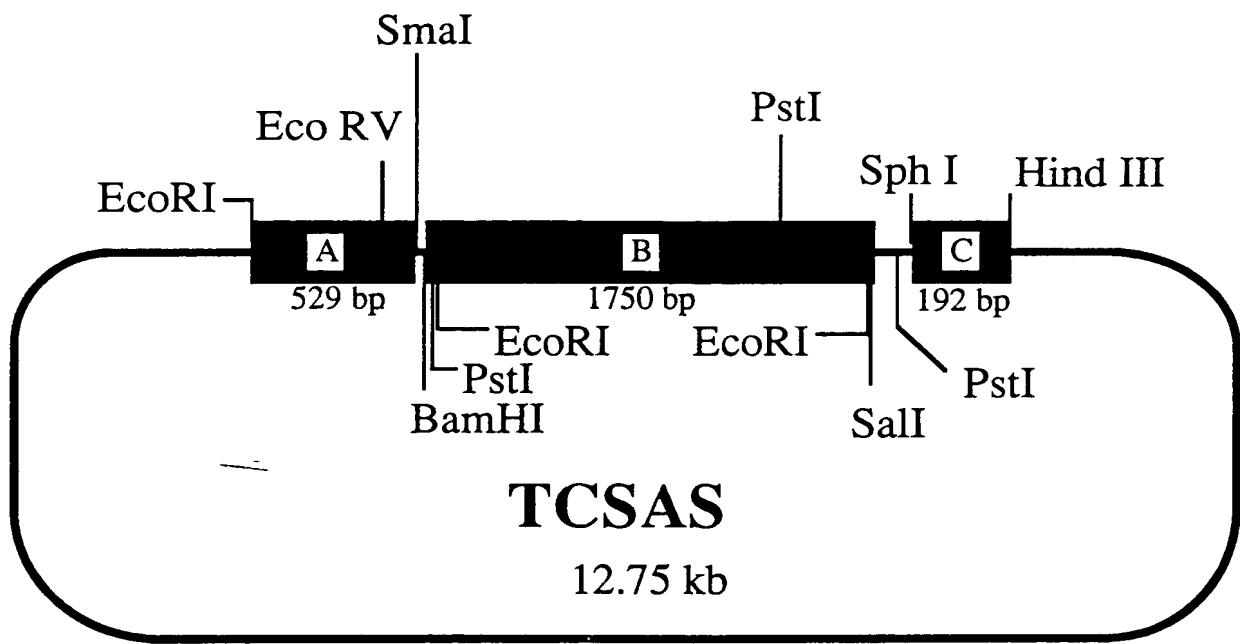


Fig. 5

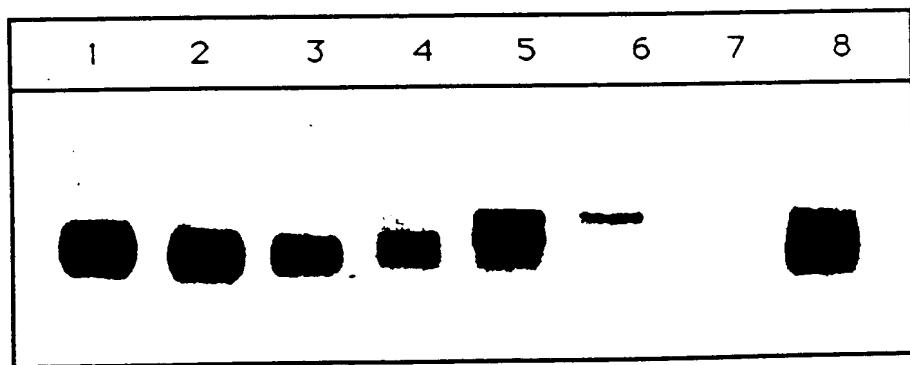


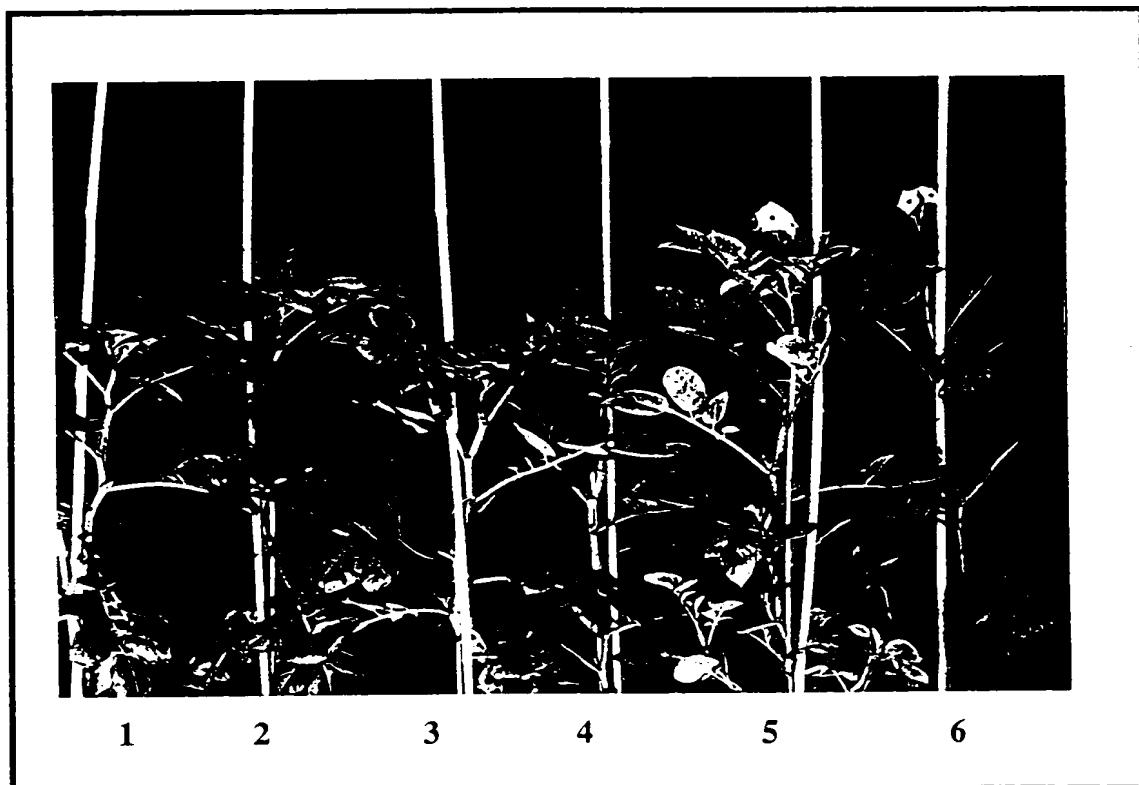
Fig. 6

**Citrat synthase-Aktivität (in nmol/min/mg Protein) in verschiedenen Organen der Pflanzen und in Mitochondrien**

	Wildtyp	T55	T50	T6	T29
Blätter	55.6± 25.0	32.7± 25.0	15.1± 8.7	15.0± 7.7	3.2± 1.2
	100%	58.8%	27.1%	27.0%	5.8%
Knollen	8.5± 3.4	4.9± 0.8	1.1± 0.3	1.6± 0.5	2.0± 0.8
	100%	57.6%	12.9%	18.8%	23.5%
Mitochondrien	1788± 492	450± 120	265± 45	260± 50	193± 118
	100%	25.2%	14.8%	14.5%	9.3%

Wildtyp= *Solanum tuberosum* cv. Désirée,  
T55, T50, T6, T29= unabhängige, transgene Kartoffellinien

**Fig. 7**



**Fig. 8**

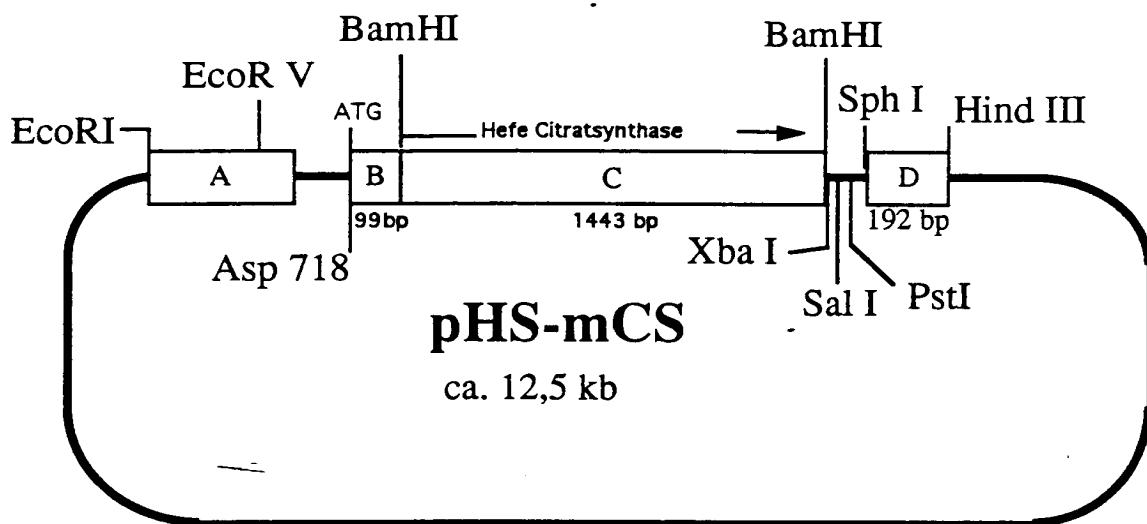


Fig. 9

### Zusammenfassung

Es werden Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung und Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen beschrieben.

Desweiteren werden DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase der Pflanze verändern, Plasmide, die diese DNA-Sequenzen enthalten, sowie transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung der DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden, beschrieben.

Bei den beschriebenen DNA-Sequenzen handelt es sich um Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*, die für das Enzym Citrat-Synthase kodieren.

Die Erfindung beschreibt weiterhin transgene Kartoffelpflanzen, bei denen es aufgrund einer Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität zu einer Inhibierung der Blütenbildung, einer Verringerung der Lagerungsverluste der Knollen und einer Veränderung des Sprossungsverhaltens kommt, sowie transgene Kartoffelpflanzen, bei denen es aufgrund der Überexpression einer Citrat-Synthase zur vorzeitigen Induktion der Blütenbildung kommt.